

На правах рукописи

Цветков Валерий Владимирович

**Функциональная активность дендритных клеток у больных
клинически различными формами хронического гепатита С**

14.01.09 – инфекционные болезни

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2016

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Сологуб Тамара Васильевна, доктор медицинских наук, профессор.

Официальные оппоненты:

Тимченко Владимир Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных заболеваний у детей им. профессора М. Г. Данилевича ГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России.

Ляшенко Юрий Иванович, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ.

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 года в 13.15 часов на заседании диссертационного совета Д 208.090.02 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 197022, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Рентгена, д. 12, зал заседания Ученого совета, 6 этаж.

С текстом диссертации можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, www.1spbgnu.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор

Александров Альберт Леонидович

Общая характеристика работы

Актуальность темы

В начале XXI века хронический гепатит С (ХГС) продолжает оставаться глобальной медицинской и социальной проблемой, актуальность которой обусловлена повсеместным распространением и высокой экономической значимостью, а также тенденцией к росту числа осложненных и хронических форм болезни. Сегодня в мире вирусом гепатита С (ВГС) инфицировано около 170 – 200 миллионов человек [Chen, 2006; Юшук, 2010]. В 60 – 85 % случаев после перенесенного острого гепатита С развивается хроническая инфекция [Westbrook, 2014]. Больные ХГС входят в группу риска развития таких угрожающих жизни осложнений, как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома [Chen, 2006]. Только в течение ближайших 20 лет вследствие увеличения в популяции доли длительно болеющих пациентов с выраженным фиброзом печени смертность от ХГС может возрасти в 2-4 раза [Deuffic-Burban, 2007]. По данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в России, ХГС занимает лидирующее место в структуре заболеваемости хроническими вирусными гепатитами (ХВГ). Несмотря на все успехи современной вирусологии и молекулярной биологии, патогенез этой хронической вирусной инфекции недостаточно изучен. Наибольший интерес для научного сообщества представляют данные по изучению механизмов взаимодействия ВГС с различными факторами иммунной защиты человека. Ключевая роль в развитии и регуляции иммунного ответа нашего организма на чужеродный агент принадлежит антигенпрезентирующим клеткам (АПК). Дендритные клетки являются наиболее профессиональными АПК, от функциональной активности которых зависит характер течения и исход инфекционного заболевания [Hart, 1997]. Известно, что вирусы гепатитов способны инфицировать дендритные клетки человека [Tsubouchi, 2004], тем самым вмешиваются в процесс их дифференцировки и созревания [Takaki, 2010;

Stranska, 2012]. В отечественной и зарубежной литературе имеются лишь единичные работы, посвященные оценке функциональной активности дендритные клетки у больных ХВГ. Более того, данные, полученные различными авторами, весьма противоречивы. Так в большинстве публикаций приводятся убедительные доказательства снижения функциональной активности дендритных клеток у больных ХГС, что, по мнению авторов, может способствовать длительной персистенции ВГС [Takaki, 2010; Stranska, 2012; Murakami, 2004; Averill, 2007; Леплина, 2009; Szabo, 2005; Ryan, 2011]. Вместе с тем некоторые исследователи, напротив, утверждают об отсутствии существенных различий в показателях функциональной активности дендритных клеток у больных ХГС и здоровых добровольцев [Velazquez, 2012; Longman, 2005].

Таким образом, можно заключить, что в настоящее время назрела необходимость в детальном изучении функциональной активности дендритных клеток у больных ХГС, что поможет не только установить особенности иммунопатогенеза ХГС, но и позволит оптимизировать действующие стандарты лечения и разработать новые методы иммунотерапии и вакцинопрофилактики этого заболевания.

Цель исследования: На основании оценки функциональной активности дендритных клеток определить степень выраженности иммунологических нарушений у больных клинически различными формами ХГС и наметить возможные методы коррекции.

Задачи исследования:

1. Дать оценку характера клинического течения заболевания у больных ХГС, включенных в исследование, с учетом активности патологического процесса и стадии фиброза печени.

2. Оценить способность дендритных клеток, выделенных от больных ХГС, к презентации антигенных эпитопов в составе молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов, к миграции в очаг воспаления, а

также к передаче ко-стимулирующих и ко-ингибирующих молекулярных сигналов.

3. У больных ХГС выявить наличие статистически значимых связей между основными клинико-биохимическими параметрами и показателями функциональной активности дендритных клеток.

4. У больных ХГС определить возможность использования интерферона гамма (IFN- γ) в качестве молекулярного агента, индуцирующего созревание и нормализующего функциональную активность дендритных клеток.

Научная новизна

Впервые изучен широкий спектр показателей функциональной активности дендритных клеток у больных клинически различными формами ХГС. Впервые выявлены фенотипические и функциональные особенности как незрелых, так и зрелых дендритных клеток, полученных из моноцитов периферической крови больных ХГС. Определены уровни экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов, хемокинового рецептора CD195, ко-стимулирующих молекул CD40, CD70, CD252 (OX40-L) и ко-ингибирующих молекул CD274 (PD-L1 / B7-H1), CD273 (PD-L2 / B7-DC). Впервые представлены данные о наличии достоверной корреляционной связи между уровнем экспрессии CD40 на поверхности зрелых дендритных клеток и уровнем вирусной нагрузки. Установлена корреляционная зависимость между процентным содержанием CD80+, CD40+, CD273+ и CD274+ зрелых дендритных клеток, полученных из моноцитов периферической крови больных ХГС, и уровнем амилазы. Выявлена корреляционная связь между уровнем экспрессии CD274 на поверхности зрелых дендритных клеток и уровнем тромбоцитов сыворотки крови больных ХГС. Впервые приведены данные о важной роли IFN- γ в регуляции дифференцировки и созревания дендритных клеток у больных ХГС.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость выполненного исследования заключается в

том, что установлены новые молекулярно-иммунологические механизмы формирования иммунной толерантности, способствующей длительной персистенции ВГС. Показано, что зрелые дендритные клетки, полученные из моноцитов периферической крови больных ХГС, характеризуются сниженной способностью к миграции из очага воспаления в регионарные лимфатические узлы, что препятствует формированию эффективного Т-клеточного иммунного ответа. Установлено, что дендритные клетки у больных ХГС характеризуются высокой способностью к поляризации иммунного ответа по Th 2 типу и ингибированию активации и пролиферации Т-лимфоцитов, что способствует длительной персистенции ВГС в организме человека. Работа имеет большое практическое значение. Продемонстрирована потенциальная эффективность включения препаратов на основе рекомбинантного IFN- γ в схемы лечения больных ХГС. Обоснована целесообразность применения активированных аутологичных дендритных клеток в качестве иммунокорректирующих агентов для лечения больных ХГС. Фенотипическая характеристика дендритных клеток может быть использована в качестве нового метода прогнозирования эффективности противовирусной терапии больных ХГС.

Методология и методы исследования

Для достижения цели диссертационного исследования использовались общенаучные и специальные методы научного познания. В качестве эмпирических методов исследования использовались общепринятые в клинической практике методы: устный опрос / беседа (сбор жалоб и данных анамнеза), физикальный осмотр (пальпация, перкуссия, аускультация), клинико-лабораторное и инструментальное обследование. Методологической основой для оценки функциональной активности ДК, полученных из моноцитов периферической крови человека, стали научные труды отечественных и зарубежных авторов [Sallusto, 1994; Romani, 1994; Thomas, 1994; Sozzani, 1997; Vanchereau, 1998; Thurner, 1999; Ito, 1999; Medzhitov, 2002]. В качестве

теоретических методов научного исследования использовались такие методы как сравнение, анализ, обобщение и формализация полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Клиническая картина заболевания у больных, включенных в исследование, соответствует общепринятому представлению о характере течения патологического процесса при ХГС. Степень выраженности холестаза у больных ХГС находится в прямой корреляционной зависимости от уровня сывороточного железа, а показатели свертывающей системы крови находятся в обратной корреляционной зависимости от стадии фиброза печени.

2. Нарушение функциональной активности дендритных клеток у больных ХГС является одним из факторов развития дисбаланса иммунного ответа с поляризацией по Th 2 типу, что в конечном итоге приводит к длительной персистенции вируса, а также к прогрессированию фиброза печени и развитию аутоиммунных реакций. У больных ХГС с начальной стадией фиброза печени и высоким уровнем виремии имеют место более выраженные нарушения функциональной активности дендритных клеток.

3. Интерферон гамма является важным иммунокорректирующим агентом необходимым для нормализации функциональной активности дендритных клеток у больных ХГС. В присутствии интерферона гамма (*ex vivo*) ускоряется процесс дифференцировки и созревания, а также снижается ко-ингибирующая активность дендритных клеток, полученных от больных ХГС.

Личный вклад автора

В рамках данной работы лично автором проведены: анализ данных литературы по теме диссертации, подбор и курация больных ХГС и здоровых добровольцев, участвующих в исследовании, статистический анализ полученных данных, написание и оформление диссертации. Автор совместно с сотрудниками лаборатории клеточных культур и клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России осуществлял выделение дендритных клеток из моноцитов периферической крови с определением

показателей их функциональной активности, что нашло отражение в совместных публикациях.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность результатов и выводов исследования подтверждается применением комплекса методов теоретического и эмпирического исследования, адекватных поставленным целям и задачам, а также репрезентативностью выборки и использованием общепринятых статистических методов обработки и анализа полученных данных. Результаты работы были представлены на научно-практических конференциях международного и российского уровня: научно-практическая конференция – биеннале «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика и лечение» (Санкт-Петербург, 2014), VI Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням (Москва, 2015). По теме диссертации опубликовано 5 научных работ в журналах, рекомендованных перечнем Минобрнауки Российской Федерации.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственного исследования, заключение, выводы, рекомендации для внедрения в медицинскую науку и практику, список сокращений и условных обозначений и список литературы, включающий 233 источника, из них 42 отечественных и 191 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 33 рисунками.

Содержание работы

Контингент и методы исследования

Настоящее исследование выполнено в 2013-2015 гг. на базе отделения экспериментальной терапии вирусных гепатитов, лаборатории клеточных

культур и клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. Под наблюдением находились 125 мужчин, страдающих ХГС 1b генотипа, средний возраст $36,35 \pm 6,4$ лет, средний индекс массы тела $27,3 \pm 3,6$ кг / м². Диагноз ХГС был установлен на основании эпидемиологических, клинико-лабораторных и инструментальных данных и подтвержден выявлением в сыворотке крови anti-HCV и РНК HCV. У большинства больных (68 %, n = 85) ХГС впервые был диагностирован в течение последних 5 лет. Никто из обследованных пациентов не имел тяжелой сопутствующей патологии в стадии декомпенсации и не получал ранее ПВТ. Все больные с циррозом печени имели класс А по шкале Child-Pugh-Turcotte.

Все больные, включенные в исследование, обследовались по общепринятой в гепатологической практике методике. При оценке состояния больного обращалось внимание на наличие жалоб, клинических проявлений заболевания с определением размеров печени и селезенки. Все лабораторно-инструментальные исследования проводились на базе лицензированных лабораторий ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. Математическая и статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программной среды статистического анализа R. Уровень значимости был принят $\alpha \leq 0,05$.

Оценка показателей функциональной активности ДК проводилась у 28 из 125 включенных в исследование больных ХГС. Все пациенты были мужчины, инфицированные 1b генотипом вируса (средний возраст $40,82 \pm 9,11$ лет, средний индекс массы тела $26,66 \pm 3,32$ кг / м²). У большинства пациентов данной группы методом транзиторной эластографии была диагностирована начальная стадия фиброза печени F 0 – 2 (64 %, n = 18), и только у 36 % больных наблюдалась продвинутая стадия фиброза / цирроз печени F 3 – 4. 61 % пациентов имели низкую вирусную нагрузку (< 800000 МЕ / мл), и у 60,5 % больных уровень АЛТ не превышал 80 Ед /л. Группу сравнения составили 15 здоровых добровольцев мужского пола, средний возраст $38,41 \pm 5,45$ лет.

Получение ДК из моноцитов периферической крови больных ХГС и здоровых добровольцев проводилось по стандартной лабораторной методике. Индукция дифференцировки моноцитов в ДК достигалась добавлением в среду гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF до концентрации 800 Ед / мл) и интерлейкина 4 (IL-4 до концентрации 1000 Ед / мл). В качестве молекулярных факторов созревания ДК использовались липополисахарид и IFN- γ . Оценка показателей функциональной активности ДК проводилась методом проточной цитометрии путем определения на поверхности клеток уровней экспрессии функциональных молекул (HLA-A,B,C, HLA-DR, CD195, CD80, CD86, CD40, CD70, CD252, CD273, CD274).

Определение терапевтической эффективности с оценкой целесообразности включения препарата на основе рекомбинантного IFN- γ в схему ПВТ проводилось у 20 больных ХГС 1b генотипа. Все больные были лицами мужского пола с продвинутой стадией фиброза печени (F 3 – 4), низкой и умеренной активностью патологического процесса. Ни один из пациентов не имел тяжелых сопутствующих заболеваний в стадии декомпенсации, все больные с циррозом печени имели стадию А по шкале Child-Pugh-Turcotte. Методом случайной выборки пациенты были разделены на 2 группы по 10 человек в каждой: основная группа и группа сравнения. Пациентам обеих групп были назначены препараты: цепаэгинтерферон альфа – 2b в дозировке 1,5 мкг на 1 кг в неделю и рибавирин в дозировке 15 мг на 1 кг в сутки. Группу сравнения составили больные ХГС 1b генотипа (средний возраст $53,60 \pm 6,29$ лет, средний индекс массы тела $25,74 \pm 2,70$ кг / м²). В основную группу вошли также 10 больных ХГС 1b генотипа (средний возраст $48,10 \pm 8,15$ лет, средний индекс массы тела $27,32 \pm 2,95$ кг / м²), в стандартную схему терапии которых был добавлен отечественный препарат на основе рекомбинантного IFN- γ в дозе 500000 МЕ подкожно через день в течение 12 недель.

Результаты исследования

У большинства обследованных нами больных (68 %, n = 85) ХГС впервые

был диагностирован в течение последних 5 лет. Ни один из пациентов, включенных в исследование, не имел тяжелой сопутствующей патологии в стадии декомпенсации. Наиболее часто у обследованных больных встречались такие сопутствующие заболевания как хронический гастрит, вне обострения (19,2 %, n = 24), гипертоническая болезнь 1-2 степени (17,6 %, n = 24), остеохондроз поясничного отдела позвоночника с грыжей поясничного отдела позвоночника (11,2 %, n = 14) и мочекаменная болезнь почек (11,2 %, n = 14). Главными субъективными признаками заболевания у 32 % больных были проявления астеновегетативного синдрома. При объективном осмотре у абсолютного большинства пациентов (88,8 %, n = 111) отмечалась гепатомегалия, у четверти – спленомегалия (25,6 %, n = 32). Почти у половины обследованных наблюдались малые печеночные знаки: у 43,2 % больных на коже определялись телеангиэктазии, а у 20,8 % – пальмарная эритема. При лабораторно-инструментальном обследовании установлено, что более чем у половины пациентов имела место начальная стадия фиброза печени (64 %, n = 80), а у 36 % больных (n = 45) была диагностирована продвинутая стадия фиброза печени F 3 – 4 (табл. 1). Отмечалась сильная корреляционная связь между стадией фиброза печени и возрастом пациентов ($r_{xy} = 0,66$, $p < 0,01$). Так средний возраст пациентов с F 3 – 4 составил $48,10 \pm 8,12$ лет, в то время как средний возраст больных с отсутствием или начальными признаками фиброза печени – $36,78 \pm 6,97$ лет. Кроме того была выявлена обратная корреляционная связь между стадией фиброза печени и показателями свертывающей системы крови: уровнем тромбоцитов ($r_{xy} = -0,61$, $p < 0,01$) и протромбиновым индексом ($r_{xy} = -0,47$, $p < 0,05$). Более чем у половины больных уровень вирусной нагрузки был менее < 800000 МЕ / мл. У 84 % больных отмечалось повышение уровней АЛТ и АСТ, а у четверти – наблюдалась гипербилирубинемия. Выявлена прямая сильная достоверная корреляционная связь между степенью гипербилирубинемии и уровнем железа сыворотки крови ($r_{xy} = 0,69$, $p < 0,01$).

Таблица 1 – Средние показатели вирусной нагрузки и АЛТ у больных ХГС (n = 125) с различной стадией фиброза печени

Число больных, абс. / %	Показатели		
	Стадия фиброза печени по шкале Metavir	Средний уровень вирусной нагрузки, Me (LQ – HQ), МЕ/мл	Средний уровень АЛТ, Me (LQ – HQ), Ед/л
30 / 24,0	F 0	610000 (100000 – 1500000)	64,50 (54,25 – 76,07)
24 / 19,2	F 1	123275 (89507 – 2852413)	75,45 (72,30 – 97,75)
26 / 20,8	F 2	1860000 (1720000 – 2000000)	105,20 (74,25 – 136,13)
22 / 17,6	F 3	261558 (180579 – 3230779)	128,00 (73,30 – 223,02)
23 / 18,4	F 4	750000 (419450 – 1150000)	100,60 (77,04 – 106,54)

Определение уровней экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов позволило оценить способность ДК к презентации антигенных эпитопов. Установлено, что созревание ДК, полученных как от здоровых добровольцев, так и от больных ХГС, сопровождалось увеличением уровней экспрессии HLA-A,B,C и HLA-DR. Значения средней интенсивности флуоресценции HLA-A,B,C и HLA-DR на поверхности зрелых ДК, полученных от больных ХГС, составили 5694,50 и 1877,00, соответственно. Статистически значимых различий между уровнями экспрессии HLA-A,B,C и HLA-DR на поверхности ДК, полученных от здоровых добровольцев и больных ХГС, выявлено не было. Таким образом, было установлено, что вне зависимости от степени фиброза печени, биохимической активности трансаминаз или уровня вирусной нагрузки зрелые ДК, полученные от больных ХГС, сохраняют способность к презентации антигенных структур в составе молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов. Между тем некоторые зарубежные исследователи приводят данные,

свидетельствующие, напротив, о снижении антигенпрезентирующей активности ДК у больных ХГС. Так в клинических исследованиях Auffermann-Gretzinger (2001), Averill (2007), Zimmermann (2008) было показано, что миелоидные ДК, выделенные из периферической крови больных ХГС, экспрессируют на своей поверхности меньшее количество молекул HLA-DR, чем ДК здоровых лиц. Кроме того, в экспериментах *ex vivo* Zimmermann (2008) установил, что миелоидные ДК, подвергшиеся воздействию Сog белка ВГС, характеризуются низким уровнем экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов. Результаты исследований других авторов указывают на снижение способности зрелых ДК у больных ХГС к презентации антигенных эпитопов вируса и запуску высокоспецифических иммунных реакций. Вместе с тем антигенпрезентирующая активность различных популяций ДК у больных ХГС требует дальнейшего изучения.

Определение уровня экспрессии на поверхности клеток хемокинового рецептора CD195 (CCR5) позволило оценить способность ДК к миграции, как в очаг воспаления, так и из него. Установлено, что незрелые ДК, полученные от больных ХГС, экспрессировали на своей поверхности большее количество хемокинового рецептора CD195, чем ДК, полученные от здоровых добровольцев (90,00 против 67,50, $p < 0,01$), что свидетельствует об их высокой способности к миграции в очаг воспаления. При созревании ДК, полученные от больных ХГС, продолжали сохранять высокий уровень экспрессии хемокинового рецептора CD195 (рис. 1). Таким образом, было установлено, что зрелые ДК у больных ХГС обладают дефектом функциональной активности и неспособны эффективно покинуть очаг воспаления и мигрировать в регионарные лимфатические узлы для запуска высокоспецифических иммунных реакций. Следовательно, изменение фенотипа зрелых ДК, связанное с увеличением уровня экспрессии CD195, можно рассматривать в качестве нового молекулярного механизма, обуславливающего массивную и длительную

инфильтрацию печени различными АПК. Аналогичные данные были получены и в исследованиях Ulsenheimer в 2005 г.

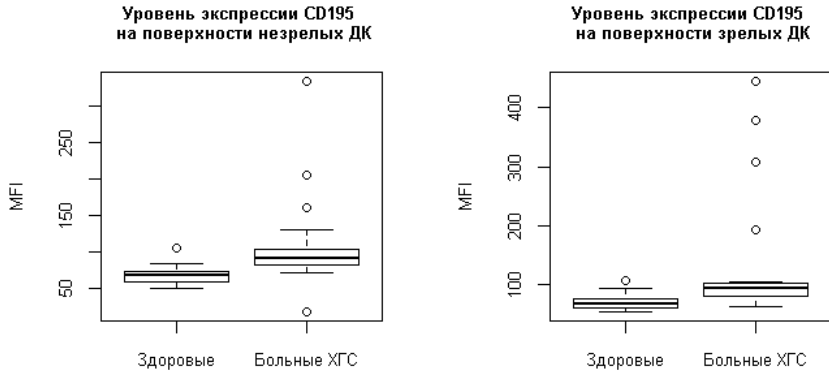


Рисунок 1

Определение уровней экспрессии на поверхности клеток ко-стимулирующих молекул CD80, CD86, CD40, CD70 и CD252 позволило оценить способность ДК к передаче ко-стимулирующего молекулярного сигнала, необходимого для активации и пролиферации антигенспецифических клонов Т-лимфоцитов. Нами установлено, что уровни экспрессии CD80, CD86 и CD40 на поверхности незрелые и зрелых ДК в группе больных ХГС не отличались от соответствующих показателей в группе здоровых добровольцев. Созревание ДК, как в контрольной, так и в исследуемой группе, сопровождалось увеличением доли клеток, экспрессирующих эти маркеры, а также увеличением средней интенсивности флуоресценции молекул CD80 и CD86. Доли CD80+ и CD86+ зрелых ДК, полученные от больных ХГС, были существенно выше, чем в контрольной группе и составили $63,35 \pm 10,33$ % и $82,70 \pm 7,83$ % против $52,69 \pm 13,3$ % и $75,34 \pm 9,71$ %, соответственно. Между тем литературные данные об

экспрессии этих молекул на поверхности ДК у больных ХГС весьма противоречивы. Так в исследованиях Auffermann-Gretzinger (2001), Averill (2007), Zimmermann (2008) было показано, что миелоидные ДК, выделенные из периферической крови больных ХГС, экспрессируют на своей поверхности меньшее количество молекул CD86 и CD80, чем ДК здоровых. Кроме того в экспериментах Zimmermann (2008) *ex vivo* также было показано, что миелоидные ДК, подвергшиеся воздействию Сог белка ВГС, характеризуются низким уровнем экспрессии ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86. Стоит отметить, что результат взаимодействия CD80 и CD86 с их рецепторами на поверхности Т-лимфоцита зависит в первую очередь от уровней экспрессии ко-стимулирующих (CD28) или ко-ингибирующих (CTLA4) рецепторов. Таким образом, изолированное изучение уровней экспрессии CD80 и CD86 на поверхности ДК не дает полного представления о результате взаимодействия ДК и Т-лимфоцита. В этой связи было принято решение расширить спектр изучаемых молекул. Известно, что по уровню экспрессии ко-стимулирующих молекул CD70 и CD252 можно судить о способности ДК к поляризации иммунного ответа [Ito, 2005; Coquet, 2012]. Полученные нами данные позволили выявить наличие вероятных функциональных дефектов ко-стимулирующей активности ДК у больных ХГС. Впервые установлено, что зрелые ДК, полученные от больных ХГС, характеризуются существенно более высокими уровнями экспрессии CD70 и CD252, чем ДК, полученные от здоровых лиц (рис. 2). Так средняя интенсивность флуоресценции CD252 на поверхности зрелых ДК в группе больных ХГС была более чем в 2 раза выше, чем у лиц контрольной группы (309,00 против 135,50, $p < 0,01$), что, вероятно, характеризует способность этих клеток к поляризации иммунного ответа строго по Th 2 типу. Наличие дисбаланса иммунного ответа у больных ХГС с поляризацией по Th 2 типу неоднократно отмечалось в исследованиях Kalams (1998), Ciurea (2001) и Wieland (2005).

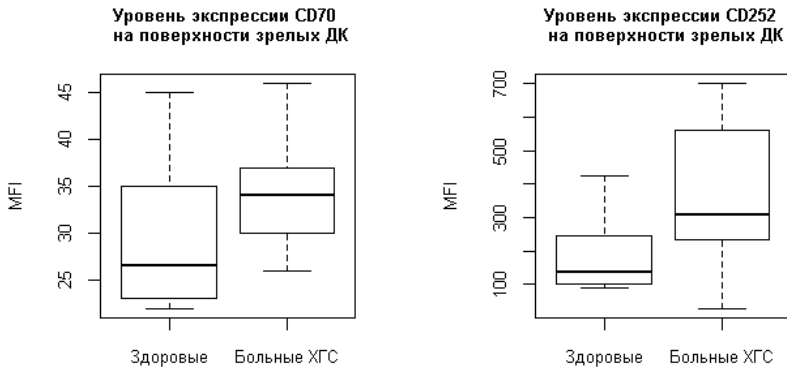


Рисунок 2

Корреляционный анализ полученных данных позволил установить обратную среднюю достоверную корреляционную связь между уровнем экспрессии CD86 на поверхности незрелых ДК и уровнем альбумина в сыворотке крови больных ХГС ($r_{xy} = -0,42$, $p < 0,05$), а также уровнем холестерина ($r_{xy} = -0,42$, $p < 0,05$) и уровнем ЛПНП ($r_{xy} = -0,39$, $p < 0,05$). Кроме того выявлена обратная средняя достоверная корреляционная связь между уровнем гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови больных ХГС и уровнями экспрессии на поверхности незрелых ДК CD80 ($r_{xy} = -0,47$, $p < 0,05$) и CD40 ($r_{xy} = -0,51$, $p < 0,05$). Анализ данных, полученных в результате фенотипирования зрелых ДК, позволил установить обратную среднюю достоверную корреляционную связь между уровнем экспрессии CD40 на поверхности зрелых ДК и уровнем «вирусной нагрузки» у больных ХГС ($r_{xy} = -0,49$, $p < 0,05$). Уровень амилазы в сыворотке крови больных ХГС обратно коррелировал с такими фенотипическими показателями, как доля CD80+ зрелых ДК ($r_{xy} = -0,56$, $p < 0,01$) и доля CD40+ зрелых ДК ($r_{xy} = -0,53$, $p < 0,01$). Кроме того, в проведенных нами исследованиях установлено, что главным

клиническим факторам, влияющими на уровень экспрессии ко-стимулирующих молекул на поверхности ДК у больных ХГС является стадия фиброза печени.

Определение уровней экспрессии на поверхности клеток ко-ингибирующих молекул CD273 и CD274 позволило оценить способность ДК к передаче ко-ингибирующего молекулярного сигнала. Такие ингибирующие молекулярные сигналы приводят к подавлению активности и пролиферации антигенспецифических клонов Т-лимфоцитов (Т-хелперов и ЦТЛ), а также к дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в индуцибельные Т-регуляторные клетки с последующим развитием иммунной толерантности. В результате оценки способности ДК к передаче ко-ингибирующих молекулярных сигналов установлено, что как незрелые, так и зрелые ДК больных ХГС характеризовались более высокими, чем в контрольной группе, уровнями экспрессии CD273 и CD274 ($78,25 \pm 6,99$ % против $66,74 \pm 8,41$ %, $p < 0,01$ и $82,41 \pm 8,56$ % против $76,75 \pm 8,98$ %, $p < 0,05$, соответственно) (рис. 3).

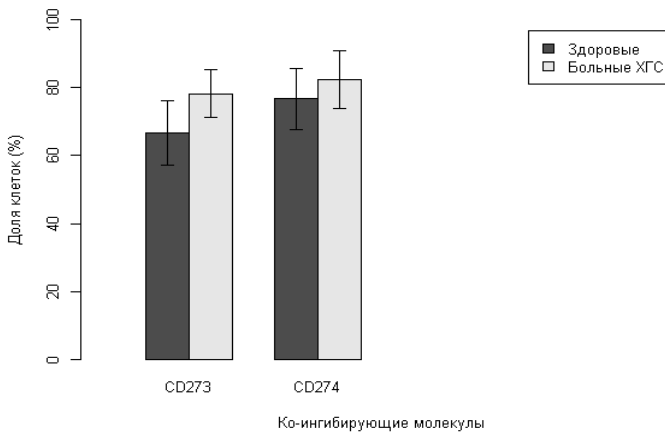


Рисунок 3 – Фенотипическая характеристика зрелых ДК (M ± S)

Кроме того средние уровни экспрессии CD273 и CD274 на поверхности зрелых ДК в группе больных ХГС были также существенно выше, чем в группе

здоровых лиц, и составили 31,00 против 21,50, $p < 0,01$ и 33,00 против 25,50, $p < 0,01$, соответственно (рис. 4).

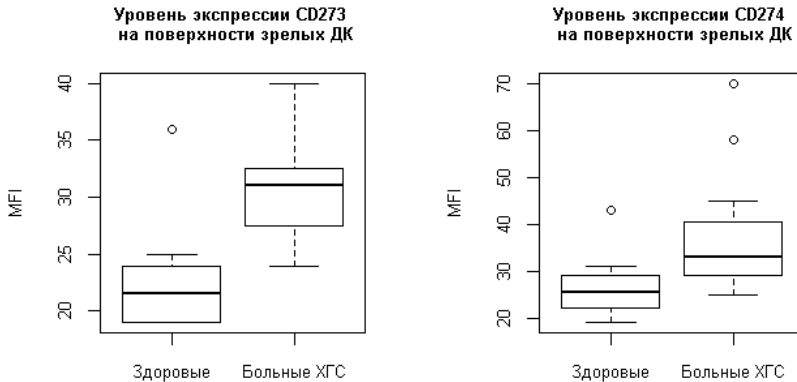


Рисунок 4

Таким образом, полученные данные позволили установить, что зрелые ДК больных ХГС обладают более выраженной способностью к ингибированию активации и пролиферации Т-лимфоцитов, чем ДК здоровых добровольцев. Наши данные принципиально совпадают с данными, полученными в экспериментальном исследовании *ex vivo* в лаборатории Циммермана (2008). В данном эксперименте было показано, что миелоидные ДК, подвергшиеся воздействию Сog белка ВГС, характеризуются высоким уровнем экспрессии ко-ингибирующей молекулы CD274.

При оценке альтернативного способа индукции созревания ДК, полученных от больных ХГС, было установлено, что в культуре, полученной с добавлением IFN- γ , доля CD273⁺ и CD274⁺ клеток была ниже, чем в культуре, полученной с добавлением только липополисахарида ($69,33 \pm 2,02$ % против $76,08 \pm 1,15$ %, $p < 0,01$ и $70,18 \pm 4,41$ % против $80,35 \pm 3,50$ %, $p < 0,01$, соответственно). Существенно отличалась также и интенсивность экспрессии

молекул CD273 и CD274 на поверхности зрелых ДК, полученных с добавлением IFN- γ и без него (29,00 против 32,50, $p < 0,05$ и 29,00 против 36,00, $p < 0,01$, соответственно). Таким образом, было установлено, что добавление в культуру незрелых ДК IFN- γ в качестве агента, индуцирующего созревание, приводит к снижению ко-ингибирующей активности зрелых ДК у больных ХГС.

При анализе клинико-лабораторных данных, полученных в результате проведения пилотного исследования по определению терапевтической эффективности с оценкой целесообразности включения препарата на основе рекомбинантного IFN- γ в схему ПВТ больных ХГС, было установлено, что быстрый вирусологический ответ был достигнут лишь у 3 из 10 больных ХГС, получавших стандартную ПВТ, а к 12 неделе терапии элиминация возбудителя была достигнута у 5 из 10 обследованных лиц. Среди больных ХГС, получающих терапию с включение IFN- γ , эффективность лечения была существенно выше. Так быстрый вирусологический ответ был достигнут у 6 из 10 пациентов данной группы, а к 12 неделе терапии вирус не определялся уже у 8 из 10 больных ХГС. Включение IFN- γ в комплексную терапию больных ХГС не сопровождалось развитием выраженных нежелательных явлений. Напротив, у пациентов, получавших IFN- γ существенно улучшалось качество жизни: повышалась работоспособность и интерес к жизни, улучшался аппетит, уменьшалась вегетативная симптоматика. Кроме того, было отмечено, что у пациентов, получавших IFN- γ , к 12 неделе терапии наблюдались более высокие, чем у пациентов группы сравнения, значения лейкоцитов и абсолютного содержания нейтрофилов ($3,9 \pm 1,2 \times 10^9 / \text{л}$ и $2,3 \pm 1,6 \times 10^9 / \text{л}$ против $3,1 \pm 0,8 \times 10^9 / \text{л}$ и $1,7 \pm 0,4 \times 10^9 / \text{л}$, соответственно). Средние значения уровней гемоглобина и эритроцитов к 12 неделе терапии в группе пациентов, получавших IFN- γ , составили $121,8 \pm 11,6 \text{ г / л}$ и $3,6 \pm 0,6 \times 10^{12} / \text{л}$ против $109,0 \pm 7,0 \text{ г / л}$ и $3,3 \pm 0,2 \times 10^{12} / \text{л}$ в группе сравнения, соответственно. Полученные нами данные согласуются с результатами, продемонстрированным в работах Фазылова В.Х. (2014) и Кремень Н.В. (2009), и свидетельствуют о важной роли

IFN- γ в регуляции дифференцировки и созревания ДК, а также о потенциальной эффективности включения препаратов на основе рекомбинантного IFN- γ в схемы лечения больных ХГС.

Выводы

1. У абсолютного большинства больных, включенных в исследование, отмечалась гепатомегалия, у 1 / 5 – гепатоспленомегалия, у половины обследованных определялись малые печеночные знаки и наблюдались признаки астеновегетативного синдрома. Выявлена обратная корреляционная связь между степенью выраженности фиброза печени и показателями свертывающей системы крови, а также прямая корреляционная связь между уровнями билирубина и сывороточного железа.

2. Установлено, что у больных ХГС, вне зависимости от стадии фиброза печени, активности АЛТ или уровня вирусной нагрузки, зрелые дендритные клетки сохраняли способность к эффективной презентации антигенных эпитопов в составе молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов, что было обусловлено высоким уровнем экспрессии молекул HLA-A, B, C и HLA-DR, а также характеризовались высоким уровнем экспрессии хемокинового рецептора CD195, что свидетельствует о нарушении их миграционной способности.

3. Уровни экспрессии ко-стимулирующих (CD80, CD86 и CD252) и ко-ингибирующих молекул (CD274 и CD273) на поверхности зрелых дендритных клеток у больных ХГС превышали соответствующие показатели у здоровых лиц, что свидетельствует о высокой их Th2-поляризующей активности и снижении способности к эффективной активации и стимуляции пролиферации Т-лимфоцитов.

4. У больных ХГС с продвинутой стадией фиброза печени уровни экспрессии ко-стимулирующих (CD80, CD86 и CD252) и ко-ингибирующих молекул (CD274 и CD273) на поверхности дендритных клеток были ниже, чем у

лиц с отсутствием фиброза или минимальными его значениями, что свидетельствует об истощении иммунологического резерва у пациентов с циррозом печени. У лиц с высоким уровнем вирусной нагрузки, вне зависимости от стадии фиброза печени, отмечалось резкое снижение уровня экспрессии ко-стимулирующей молекулы CD40, продукция которой, по-видимому, блокировалась вирусом или его белками.

5. Использование интерферона гамма в качестве иммунокорректирующего агента *ex vivo* способствовало снижению уровней экспрессии ко-ингибирующих молекул (CD273 и CD274) на поверхности зрелых дендритных клеток, полученных от больных ХГС. Включение препарата Ингарон в стандартную схему ПВТ больных ХГС является патогенетически обоснованным и целесообразным.

Рекомендации для внедрения в медицинскую науку и практику

Определение функциональной активности ДК у больных ХГС может быть использовано для оценки эффективности ПВТ, в том числе для определения продолжительности лечения и решения вопроса о возможности досрочного его прекращения. С учетом результатов, полученных в настоящем исследовании, нами разработан протокол клинической апробации: «Апробация метода прогноза эффективности противовирусной терапии, основанного на оценке функциональной активности дендритных клеток у больных хроническим гепатитом С 1 генотипа».

Представляется перспективным и патогенетически обоснованным метод лечения, основанный на применении дендритноклеточных вакцин, содержащих консервативные антигенные эпитопы белков ВГС, разработка которого позволит повысить эффективность лечения больных ХГС, в том числе и пациентов с циррозом печени.

Включение в стандартную схему ПВТ препаратов на основе рекомбинантного IFN- γ является патогенетически обоснованным и может быть

рекомендовано для внедрения в медицинскую практику.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Сологуб, Т.В. Возможности использования интерферона-гамма в комплексной терапии больных хроническим гепатитом С / Т.В. Сологуб, И.И. Токин, В.В. Цветков, Э.Г. Деева // Инфекционные болезни. - 2013. - Т. 11, № 2. - С. 74-80.

2. Сологуб, Т.В. Возможности и перспективы включения третьего препарата в схему лечения больных хроническим гепатитом С / Т.В. Сологуб, В.В. Цветков, Э.Г. Деева, И.И. Токин // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2013. - Т. 5. - С. 9-14.

3. Сологуб, Т.В. Оценка качества жизни больных ХГС, получающих комбинированную противовирусную терапию / Т.В. Сологуб, В.В. Цветков, О.Е. Никитина, Н.В. Дунаева, И.И. Токин // Инфекционные болезни. - 2014. - Т. 12, № 2. - С. 15-20.

4. Цветков, В.В. Биология дендритных клеток человека и их роль в инфекционной патологии / В.В. Цветков, Т.В. Сологуб, И.И. Токин // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. - 2014. - № 3. - С. 68-74.

5. Цветков, В.В. Антигенпрезентирующая активность дендритных клеток у больных ХГС 1 генотипа / В.В. Цветков, Т.В. Сологуб, А.В. Слита, И.И. Токин, Е.С. Анхимова // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2015. - Т. 20, № 6. - С. 26-32.

Список сокращений

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АПК – антигенпрезентирующая клетка

АСТ – аспаратаминотрансфераза

ВГС – вирус гепатита С

ДК – дендритная клетка

ПВТ – противовирусная терапия

ХВГ – хронический вирусный гепатит

ХГС – хронический гепатит С

CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

HLA (human leukocyte antigen) – человеческий лейкоцитарный антиген

IFN- γ – интерферон гамма

Подписано в печать 19.04.2016 г. Формат 60×84/16.

Бумага писчая. Уч. – изд. л. 1,0. Тираж 100 экз.